

**Aufnahme und Abbau von Low Density Lipoproteinen
durch Hautfibroblasten von Patienten mit
familiärer Hypercholesterinämie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

Rossiza Soltani

Sofia, Bulgarien
1979

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor (Vorstand) : Prof. Dr. N. Zöllner

TITEL DER ARBEIT

Aufnahme und Abbau von Low Density Lipoproteinen durch
Hautfibroblasten von Patienten mit familiärer Hyper-
cholesterinämie.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde an
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Rossiza S o l t a n i

aus

Sofia, Bulgarien

Jahr

1 9 7 9

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. Ch. Barth

Mitberichterstatter : Prof. Dr. N. Zöllner

Dekan : Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 12.6.1980



Meinem Sohn Amir

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S :

EINLEITUNG Seite 1

I. FRAGESTELLUNG Seite 3

II. EXPERIMENTELLER TEIL Seite 5

1. Zellzüchtung

2. Lipoproteinisolierung

3. Lipoproteinmarkierung

4. Gewinnung des LP-freien (LDL-freien)

Serums

5. Durchführung der radioaktiven Versuche

III. ERGEBNISSE Seite 15

1. Vergleichende Untersuchungen der
Aufnahme von ^{125}J -LDL von Gesunden
und PHC-Patienten

2. Modifizierung der LDL-Aufnahme durch
enzymatische Andauung und Dextranzugabe

IV. DISKUSSION Seite 25

V. ZUSAMMENFASSUNG Seite 28

VI. LITERATUR Seite 29

E I N L E I T U N G

Die Hyperlipoproteinämie Typ II (Hypercholesterinämie) ist eine dominant autosomal vererbte Krankheit. Die Symptome der heterozygoten Träger sind weniger ausgeprägt als die der homozygoten Kranken. Es kommt zu einer starken Erhöhung der β -Lipoproteine mit Vermehrung des Cholesterins und auch der Phosphatide. Beweisend ist die isolierte Vermehrung der β -Lipoproteine und des in ihnen enthaltenen vermehrten Cholesterins = β -Cholesterin.

Schon in den ersten Lebensjahren kommt es zu erhöhten Cholesterinspiegeln, frühzeitiger coronarer Arteriosklerose, schließlich zum Herzinfarkt. Parallel treten Xanthome an den Sehnen (Achillessehne), Ellenbogen und Handrücken auf. Auch die Prognose des heterozygoten Patienten ist ungünstig wegen der progredienten Atheromatose. Die bisher zuverlässigste klinische Messgröße, das LDL-Cholesterin, erlaubt insbesondere bei Erwachsenen keine eindeutige Abgrenzung gegenüber Gesunden.

Khachadurian und besonders die Gruppe von Goldstein und Brown (1) untersuchten Hautfibroblasten der Patienten und fanden im Vergleich zu Gesunden eine stark verminderte Aufnahme von ^{125}J -LDL in den Hautfibroblasten.

Die Autoren postulieren einen Rezeptor für LDL an der Fibroblastenoberfläche, der beim Homozygoten ganz und

beim Heterozygoten teilweise fehlt.

Der Rezeptor soll folgende Wirkungen haben:

1. Er vermittelt die Aufnahme von LDL in die Zelle
2. Dadurch wird die Cholesterinsynthese gehemmt
3. Die Cholesterinveresterung in der Zelle nimmt zu

Levy und Langer führten 1969 Untersuchungen bei Patienten mit HLP Typ II und haben festgestellt, daß die Elimination der markierten Substanz ($^{125}\text{J-LDL}$) aus dem Plasma nach Injektion bei Patienten mit HLP Typ II deutlich verlangsamt ist (11).

Dies könnte auf einen verlangsamen Abbau der β -Lipoproteine (LDL) hinweisen, in Übereinstimmung mit den Befunden von Goldstein und Brown (1).

I. FRAGESTELLUNG

Außer den Studien von Goldstein und Brown (1) und einer kleineren Studie von Ropers et al gibt es noch keine breitere Anwendung von Fibroblastenuntersuchungen für die Diagnose der familiären Hypercholesterinämie. Es sollte geprüft werden, ob die von Goldstein und Brown erarbeiteten Parameter (1) die Diagnose einer familiären Hypercholesterinämie sicherer ermöglichen als die bisherigen Laboruntersuchungen, insbesondere die Messung des LDL-Cholesterins.

Das erste Ziel war somit, die in der Medizinischen Poliklinik behandelten und durch familiären Zusammenhang als heterozygot gesicherten Patienten zu untersuchen und festzustellen, ob eine Überlappung der Werte von Gesunden und Heterozygoten einerseits und Heterozygoten und Homozygoten andererseits festzustellen war.

Zusätzlich sollten Patienten, die nach blutchemischen Parametern wahrscheinlich heterozygot sind, bei denen aber keine Familienuntersuchung vorliegt, geprüft werden. Als Parameter wurde die Bindung von ^{125}J -LDL an Hautfibroblasten gewählt, weil eine fehlende oder defekte Bindung von LDL nach Goldstein und Brown der primäre Defekt bei der familiären Hypercholesterinämie sein soll. Von besonderem Interesse war das in die Zellen aufgenommene (internalisierte) LDL, weil bei dieser Größe ausgeschlossen ist, daß an Plastik der Kulturschalen gebundenes LDL (Goldstein et al) mitgemessen wird.

Ein anderes Ziel der Studien war es, mehr Einblick in die Pathogenese der familiären Hypercholesterinämie zu gewinnen und im Hinblick auf eine mögliche Therapie, Beeinflussungsmöglichkeiten der LDL-Bindung zu untersuchen.

Es wurde untersucht, ob LDL von Gesunden genauso gebunden werden wie LDL von Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie. Flotte et al (7) berichteten, daß die Cholesterinspiegel von Hypercholesterinämikern durch Dextraninfusionen deutlich gesenkt werden konnten. Deshalb wurde untersucht, ob Dextran in der Zellkultur die LDL-Aufnahme beeinflußt.

Neuraminsäure von Glycoproteinen (25) verzögert deren Elimination aus dem Plasma. Es wurde daher untersucht, ob Aufnahme und Abbau von LDL durch Inkubation der LDL mit Neurasaminidase beschleunigt werden können.

Um Einblick in die Struktur des LDL-Rezeptors zu gewinnen, wurden die Zellen mit Glucosaminidase vorinkubiert. Einige Glycoproteine der Zelloberfläche enthalten ein endständig gebundenes N-Acetylglucosamin. Globosid enthält ein terminales N-Acetylgalantosamin.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Die Zellzüchtung

a) LDL - Ursprung

Gesunde : 28 J. (Mann)

29 J. (Frau)

32 J. (Mann)

FHC (homozygote) : 13 J. (männlich)

14 J. (weiblich)

Hautfibroblasten : Gesunde : (14-38 J.) 6 Männer
3 Frauen

FHC heterozygot : 8 Klinikpatienten

FHC homozygot : 13 J., männlich

14 J., weiblich

GM 488

GM 1112

GM 376

(GM = aus dem Institute for Medical
Research, Camden N.J.)

b) Gewinnung der Zellkulturen

Mit Pinzette und Skalpell wurden über dem M. deltoideus ca. 2-3 mm³ große Hautbiopsien entnommen, in ca. 0,5 mm³ große Teile geschnitten, in Petrischalen (Falcon) von 6 cm Durchmesser gelegt und mit einem 1 cm² großen Deckgläschen, das an einer Ecke mit Silikonfett am Boden bestift war, abgedeckt.

Dann wurde Medium zugegeben und alle 3 Tage gewechselt.

Nach ca. 10 Tagen begannen die Fibroblasten auszuwachsen. War der Monolayer dicht, wurde trypsinisiert, und die Zellen weiter, wie unten beschrieben, gezüchtet.

c) Routinezüchtung (18)

Als Medium wurde Minimal Essential Medium nach Eagle (18) verwendet. Es wurde mit

- 20 mMol Hepes und NaHCO₃ 0,85 g/l bei einer CO₂-Konzentration von 4% in Luft gepuffert, mit
- 2 mMol L-Glutamin, 1 x nicht essentiellen Aminosäuren angereichert und mit
- 10%-igem fetalem Kälberserum versetzt.

Alle 3 Tage wurde das Medium gewechselt, konfluente Kulturen wurden 2 x mit PBS gewaschen und mit einem dünnen Film von 0,02%igem Trypsin in Puck's Lösung bedeckt (0,05 ml/cm²).

Nach Inkubation bei 37°C hatten sich die zuerst spindelförmigen Fibroblasten nach ca. 10 Minuten als kugelige Gebilde vom Boden abgelöst.

Darauf wurde Medium zugegeben und die Zellsuspension im Verhältnis 1 : 3 in neue Kulturflaschen (Falcon cm³) verteilt. Konfluenz wurde gewöhnlich nach 5 Tagen erreicht.

2. Lipoproteinisolierung (8, 9, 10)

Frisch entnommenes EDTA-Blut von gesunden Kontrollpersonen und von zwei Patienten mit familiärer homozygoter Hypercholesterinämie, die 16 Stunden gefastet hatten, wurde bei 1000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipetiert, 3/11 Volumen H₂O zugegeben, 20 Stunden mit 40 000 rpm im (ti 60 Rotor einer Beckmann L5 Ultrazentrifuge) bei 10°C zentrifugiert, und die LDL mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgehebert.

Dann wurde die Dichte durch Zugabe von festem KBr auf 1,019 g/ml erhöht und wieder unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die LDL₁ (d 1,006 - 1,019 g/ml) wurde anschließend abgehebert und die Dichte auf 1,063 g/ml erhöht. Nach erneuter Zentrifugation wurde die orange-gelbe LDL₂-Bande abgehebert, in 25 ml KBr-Lösung (d = 1,063 g/ml) gelöst und wieder bei der gleichen Dichte zentrifugiert.

Die nun höher gereinigte Bande wurde gegen 0,9% NaCl 5 x bei 4°C (Visking, Serva, Heidelberg) dialysiert, durch Millipore-Filter steril filtriert und nach Entnahme von Aliquots für Protein- und Cholesterinbestimmung (14, 15) bei 4°C aufbewahrt.

3. Lipoproteinmarkierung (LDL) (19, 20)

Zu 1nMol LDL wurde

- 1) 1 ml 0,9% NaCl
- 2) 0,5 nMol ^{125}Jod monochlorid (spez. Aktivität 10-20 Ci/Mol)
und
- 3) 0,5 ml 1M Glycerinpuffer (pH 8,5) zugegeben.

Nach 3 Stunden Schütteln wird das nicht gebundene ^{125}Jod (als Monochlorid) durch Gelchromatographie über eine 2 cm x 30 cm Säule Biogel P10 (Bio-Rad) (0,9% NaCl) abgetrennt.

Die jodierte LDL wurde gegen 0,9% NaCl (10 Stunden, 5 x Wechsel) dialysiert. TCA unlösliches Protein wurde durch Zugabe von 1 : 1 TCA (1,2 M) und Erhitzen bei 60°C präzipitiert und durch Zentrifugation (2000g/min) abgetrennt.

4. Gewinnung des LP-freien (LDL-freien) Serums (1)

Zu fetalem Kälberserum (Gibco) wurden 0,3517 g/ml festes KBr zugegeben und 40 Stunden bei 10°C mit 40 000 rpm in einem (Ti 60 Rotor einer Beckmann L5 Zentrifuge) zentrifugiert. Dann wurden die Lipoproteine vorsichtig abgehebert.

Der Unterstand wurde gegen 0,9% NaCl bei 5-maligem Wechsel der Dialysierflüssigkeit 12 Stunden bei 4°C dialysiert, dann hat man Aliquots für Cholesterin und Proteinbestimmung entnommen und den Rest durch Millipore-Filter steril filtriert und bei 20°C aufbewahrt.

Lipoproteinfreies Medium wurde durch Zugabe von lipoproteinfreien Substanzen zum Minimal Essential Medium (MEM), das wie beschrieben angereichert und gepuffert war (0,7 g Eiweiß/ml), hergestellt.

5. Durchführung der radioaktiven Versuche (1, 21)

a) Aufnahmemessung.

Die Fibroblasten wurden 3 - 4 Tage inkubiert, bis sich konfluente Monolayer bildeten.

Danach wurden sie mit lipoproteinfreiem Serum und dann mit ^{125}LDL inkubiert. Die oben genannten und markierten Lipoproteine ($^{125}\text{-J-LDL}$) wurden zur Durchführung der radioaktiven Versuche verwendet.

Damit die Fibroblasten die markierten LDL aufnehmen oder an der Oberfläche binden, wurden sie bei folgenden Bedingungen inkubiert:

Am 3 - 4 Tag nach dem Splitten wurden die konfluenten Monolayer mit 0,15 ml/cm² lipoproteinfreiem Medium für 24 oder 48 Stunden vorinkubiert in Anlehnung an Brown und Goldstein.

Die im Ergebnisteil für die einzelnen Versuche angegebenen Mengen $^{125}\text{J-LDL}$ wurden zugegeben (10 μg LDL-Protein/ml). Die Inkubation bei 37°C und 4°C dauerte 1 - 6 Stunden.

Danach wurde das Medium abgegossen und für die Messung der Abbauprodukte bei -20°C aufbewahrt.

Die Zellen wurden 2 x mit Rinderserumalbumin (1% in PBS) gewaschen, 7,5 ml/75 cm² Schale, Trypsinlösung zugegeben und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wird 5 Minuten mit 600 g bei 4°C zentrifugiert.

- Die Trypsinlösung wird abpipetiert und gesondert im Berthold Gammazähler (BF 5300) gemessen.
- Die Zellen wurden anschließend in 1 ml 0,9% NaCl-Lösung suspendiert und mit einem Ultraschallgerät 10 Sekunden mit 50 Watt beschallt.

Ein Aliquot wurde zur Proteinbestimmung entnommen und der Rest, wie oben, beschallt.

Die Gesamtaufnahme war die Summe der Radioaktivitäten im Trypsinat und in den Zellen. Die mit Trypsin ablösbare ^{125}J -LDL wurde als an der Zelloberfläche lokalisiert betrachtet, die Aktivität in den Zellen als internalisiert.

b) Abbaumessung.

In Anlehnung an Brown und Goldstein (1) wurde das ins Medium ausgeschiedene ^{125}J -Tyrosin als Maßstab für die intrazelluläre Proteolyse von ^{125}J -LDL betrachtet. Dafür wurden die Inkubationsmedien

- mit gleichen Volumina 1,2 M Trichloressigsäure versetzt.
- 5 Minuten auf 95°C erhitzt (Protein fällt aus).
- gekühlt und abzentrifugiert.

Durch die Zentrifugation werden die Proteine einschließlich LDL sedimentiert. Nach Abhebung des Überstandes wurde die Radioaktivität der Proteine gezählt.

Sie enthielten nicht aufgenommene ^{125}J -LDL.

Der Überstand wurde mit

- Kaliumjodidlösung und

- 0,15 ml 30%Wasserstoffperoxid versetzt

- dann 2 Volumina Chloroform zupipettiert und heftig geschüttelt.

Es bilden sich zwei Phasen. Die wässrige Phase enthält das ^{125}J -Tyrosin. Die Chloroformbase enthält ^{125}Jod . Dieses stammt aus nicht kovalent gebundenen $^{125}\text{-Jodid-Ionen}$, die durch den Oxidationsschritt in elementares Jod überführt wurden.

Die Oberphase wurde mit der gleichen Menge Chloroform versetzt. Nach Schütteln wurde die Oberphase ebenfalls abgehebert und gezählt. Die Chloroformphasen wurden ebenfalls gezählt.

Bedeutung der einzelnen Reinigungsschritte:

Nach Fällung mit Trichloressigsäure bleiben keine Eiweiße in Lösung, insbesondere kann man sicher sein, daß Apoprotein-B quantitativ ausgefällt wurde.

Nun gilt es, das nicht kovalent, sondern ionisch gebundene ^{125}Jod zu entfernen. Dies geschieht nach Oxidation zu elementarem Jod, daß mit Chloroform ausgeschüttelt werden kann.

Nur das kovalent gebundene ^{125}Jod kann ein Maß für die intrazelluläre Apoprotein-B-Hydrolyse sein, weil sein Anteil an der Markierung des Apoproteins bis zur Hydrolyse höchstwahrscheinlich konstant bleibt, während ionisch gebundenes ^{125}Jod während der Aufnahme in der Zelle abdissoziiert werden kann. Die Messung der Aktivität in der Chloroformphase hat den Sinn, den Anteil des ionisch gebundenen Jods in der $^{125}\text{J- LDL-Präparation}$ abzuschätzen, im Sinne einer Qualitätskontrolle der Markierung.

III. E r g e b n i s s e

1. Vergleichende Untersuchungen der Aufnahme von ^{125}J -LDL aus Seren Gesunder und von Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie.

Eine veränderte Struktur der Low-density Lipoproteine bei der familiären Hypercholesterinämie ist nach bisherigen Berichten sehr wahrscheinlich (3, 5). Es wurde deshalb vergleichend die Aufnahme der ^{125}J -LDL von Gesunden und FHC-Patienten untersucht.

Wurde ^{125}J -LDL von Gesunden zu Zellen von Gesunden, Heterozygoten und Homozygoten zugegeben, so wurden Unterschiede in der Aufnahme im Sinne von Brown und Goldstein (1) beobachtet. Wie in Abb. 1 dargestellt, nehmen gesunde Zellen wesentlich mehr ^{125}J -LDL auf als homozygote Zellen. Die Werte der Heterozygoten liegen zwischen den Werten der Gesunden und der Homozygoten.

Diese Unterschiede in der Aufnahme wurden auch gefunden, wenn ^{125}J -LDL von homozygoten Kranken zugegeben wurde (Abb. 1). Allerdings wird ^{125}J -LDL von Homozygoten etwas weniger aufgenommen als ^{125}J -LDL von Gesunden. Dies fällt besonders auf, wenn ^{125}J -LDL von Homozygoten zu Zellen von Homozygoten zugegeben wird (Abb. 1).

Die Aufnahme ist in allen Kombinationen über 6 Stunden linear. Dagegen erfolgt die Kumulation von Abbauprodukten im Medium nicht linear, sondern in etwa exponentiell (Abb. 2). Das ist a priori zu erwarten, insofern zwischen Aufnahme und Abbau eine precursor-produkt-Beziehung besteht (23).

Die langsamere Aufnahme der LDL von Homozygoten hängt wahrscheinlich von der Struktur der LDL ab. Die Studien von Agostini und Seidel (1973) an Lipoproteinen vom Gesunden zeigen gleichförmige und runde LDL, während bei Kranken mehr längliche LDL mit Neigung zur Kettenbildung dargestellt werden. Ob derartige Strukturvarianten durch verlangsamten LDL-Abbau entstehen können, ist noch unklar.

2. Modifizierung der LDL-Aufnahme durch enzymatische Andauung und Dextranzugabe.

Die Beeinflussbarkeit der LDL-Aufnahme und des Abbaus der LDL durch enzymatische Modifikation der Zell- oder LDL-Oberfläche wurden untersucht, wie auch die Beeinflussung durch Zugabe von Dextran (1% Molukulargewicht 70.000).

Die Hautfibroblasten wurden nach der Vorinkubation mit Lipoproteinfreiem Medium, einmal mit PBS gewaschen und mit 0,1 E/ml N-Acetylglucosaminidase aus Rindernieren im Acetatpuffer 0,05 M, pH 6.5, 0,15 M NaCl, bei 37°C 30 Minuten inkubiert.

Anschließend wurde der Puffer abpipettiert und die Inkubation mit ^{125}J -LDL in lipoproteinfreiem Medium durchgeführt. Kontrolluntersuchungen mit Puffer, ohne Enzym wurden durchgeführt. Durch Andauung der Zellen mit N-Acetylglucosaminidase aus Rindernieren wurde die Aufnahme reduziert (Tabelle 1).

^{125}J -LDL wurden mit Neurasaminidase aus *Vibrio cholerae* (0,2 E/mg LDL-Protein), 0,5 Stunden bei 37°C im Acetatpuffer, 0,05M, pH 6,5 inkubiert, anschließend gegen PBS dialysiert und nach Erhöhung der Dichte auf 1,063 g/ml mit KBr durch Flotation gereinigt. Dagegen wurde der LDL-Abbau gesteigert, wenn die LDL mit Neuraminidase angedaut wurde (Tabelle 3).

Der gleiche Effekt wurde erzielt, wenn Dextran zugegeben wurde und zwar vor allem bei FHC-LDL-Zugabe (Tabelle 4.5).

Abb.1 Internalisation von ¹²⁵J-LDL in Prozent der zugegebenen Radioaktivität.
10 µg (LDL-Protein)/ml lipoproteinfreies Medium wurde für die angegebenen Zeiten zugefügt.

● Kontrollzellen und homozygote Zellen ▲ heterozygote Zellen

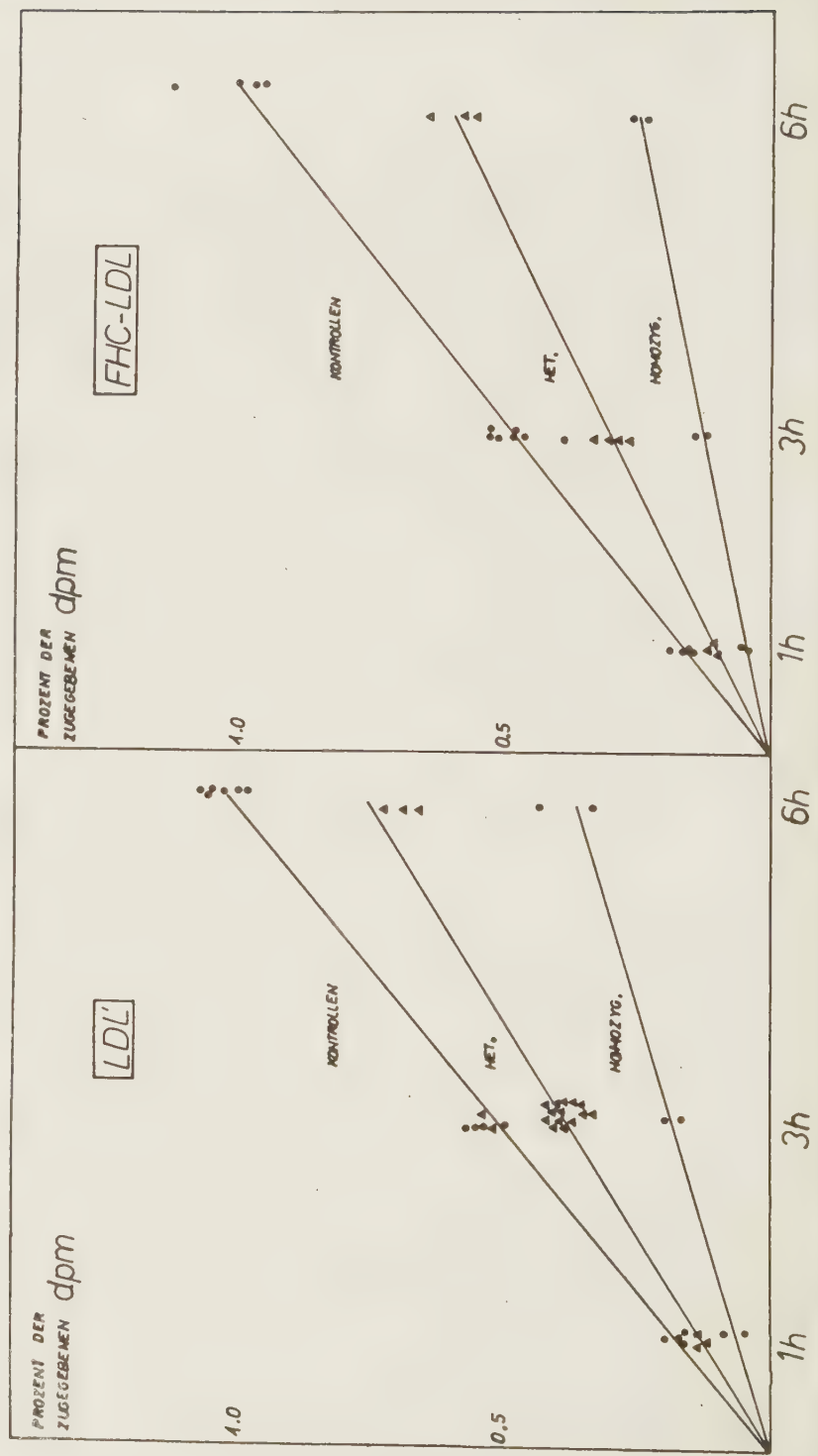


Abb.2 Abbau von ^{125}J -LDL ausgedrückt in % der zugegebenen Radioaktivität

● Kontrollzellen ▲ heterozygoten ○ homozygoten

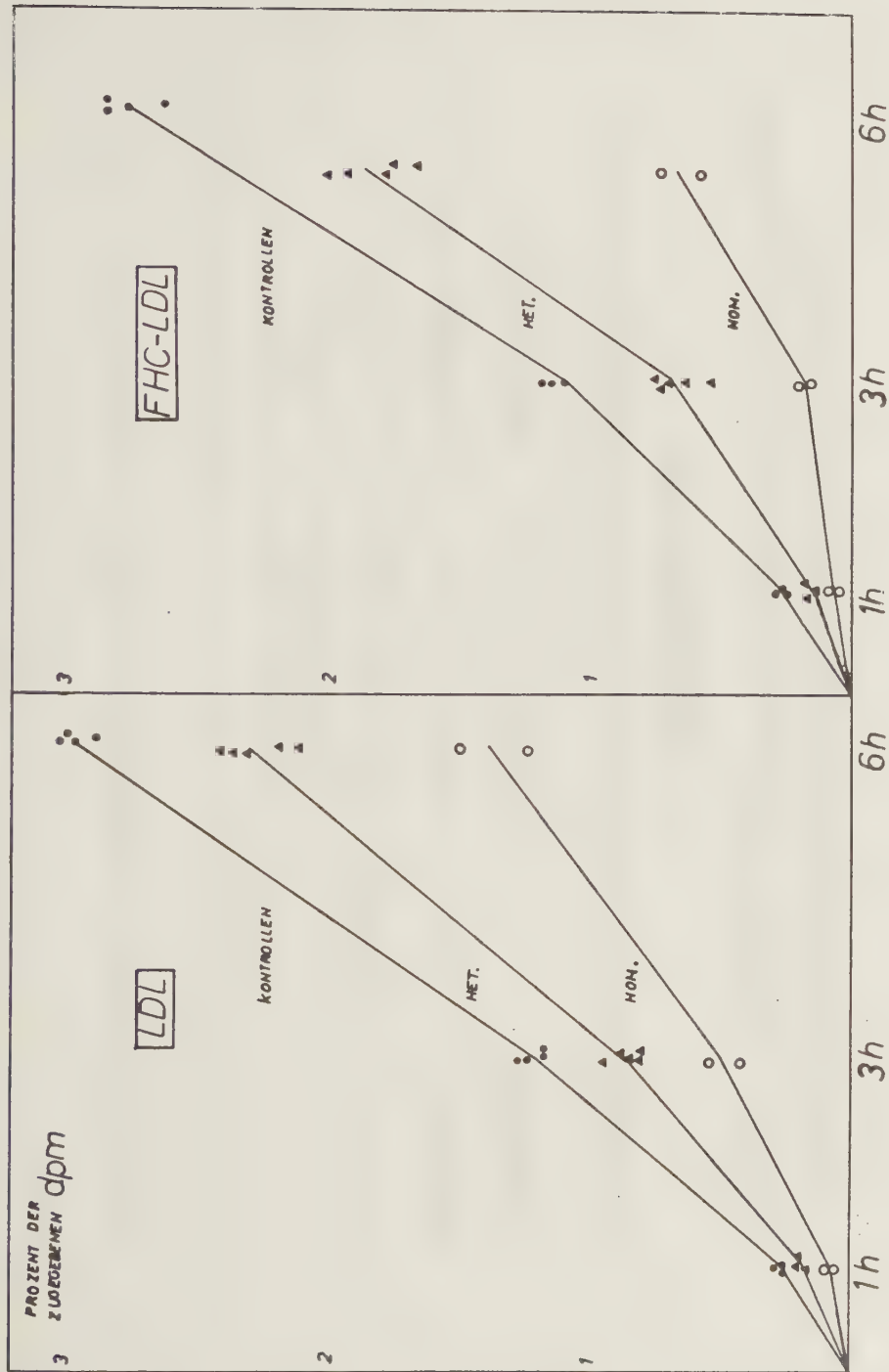


Tabelle 1

Einfluß von β -Hexosaminidaseinkubation der Zellen auf die ^{125}J -LDL-Aufnahme

Numerische Verhältnisse der aufgenommenen Radioaktivitäten mit und ohne Vorinkubation der Zellen mit β -Hexosaminidase:

$$\frac{\text{vorinkubiert}}{\text{nicht vorinkubiert}} \left(\frac{\text{dpm}}{\text{dpm}} \right)$$

Wiedergegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 5 gesunden und 4 Homozygoten. (n) drückt die Zahl der untersuchten Zelllinien aus.

<u>Lipoprotein</u>	<u>Zellen</u>	<u>Verhältnis $\pm$ SD</u>
LDL von gesunden Spendern	Zellen von Gesunden (n = 5)	0,81 $\pm$ 0,07
	Zellen von Homozygoten (n = 4)	0,69 $\pm$ 0,05
LDL von homozygoten Spendern	Zellen von Gesunden (n = 5)	0,72 $\pm$ 0,045
	Zellen von Homozygoten	0,73 $\pm$ 0,06

Tabelle 2

Einfluß von β -Hexosaminidaseinkubation der Zellen auf die Ausscheidung von ^{125}J -LDL-Abbauprodukten

Numerische Verhältnisse der ausgeschiedenen Radioaktivitäten, mit und ohne Vorinkubation der Zellen mit β -Hexosaminidase:

$\frac{\text{vorinkubiert}}{\text{nicht vorinkubiert}} \quad \left(\frac{\text{dpm}}{\text{dpm}} \right)$

Mittelwerte, Standardabweichungen und n sind dargestellt, wie in Tabelle 1.

<u>Lipoproteine</u>	<u>Zellen</u>	<u>Verhältnis $\pm$ SD</u>
LDL von Gesunden	Zellen von Gesunden (n = 5)	0,83 $\pm$ 0,06
	Zellen von Homozygoten (n = 4)	0,79 $\pm$ 0,06
LDL von Homozygoten	Zellen von Gesunden (n = 5)	0,89 $\pm$ 0,04
	Zellen von Homozygoten (n = 4)	0,88 $\pm$ 0,08

Tabelle 3

Einfluß von Neuraminidaseinkubation der ^{125}J -LDL auf die Akkumulation von ^{125}J -LDL-Abbauprodukten im Medium

Numerische Verhältnisse der ausgeschiedene Radioaktivitäten mit und ohne Vorinkubation der ^{125}J -LDL mit Neuraminidase:

vorinkubiert $\left(\frac{\text{dpm}}{\text{dpm}}\right)$
nicht vorinkubiert

Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 5 Gesunden und 4 Homozygoten. (n) drückt die Zahl der untersuchten Zellininein aus.

<u>Lipoprotein</u>	<u>Zellen</u>	<u>Verhältnis $\pm$ SD</u>
LDL von gesunden Spendern	Zellen von Gesunden (n = 5)	1,25 $\pm$ 0,09
	Zellen von Homozygoten (n = 4)	1,20 $\pm$ 0,10
LDL von Homozygoten	Zellen von Gesunden (n = 5)	1,43 $\pm$ 0,12
	Zellen von Homozygoten (n = 4)	1,22 $\pm$ 0,08

Tabelle 4

Einfluß von Dextran auf die Aufnahme von $^{125}\text{J-}^1\text{LDL}$

Numerische Verhältnisse der aufgenommenen Radioaktivitäten mit und ohne Dextransatz zum Medium:

$$\frac{\text{mit Dextran}}{\text{ohne Dextran}} \quad \left(\frac{\text{dpm}}{\text{dpm}} \right)$$

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Gesunden und 4 Homozygoten. (n) drückt die Zahl der untersuchten Zelllinien aus.

<u>Lipoprotein</u>	<u>Zellen</u>	<u>Verhältnis $\pm$ SD</u>
LDL von Gesunden	Zellen von Gesunden (n = 5)	1,07 $\pm$ 0,05
	Zellen von Homozygoten (n = 4)	1,14 $\pm$ 0,04
LDL von Homozygoten	Zellen von Gesunden (n = 5)	1,48 $\pm$ 0,11
	Zellen von Homozygoten (n = 4)	2,06 $\pm$ 0,14

Tabelle 5

Einfluß von Dextran auf die Akkumulation von ^{125}J -LDL-Abbauprodukten im Medium

Numerische Verhältnisse der ausgeschiedenen Radioaktivitäten mit und ohne Dextransatz zum Medium:

$$\frac{\text{mit Dextran}}{\text{ohne Dextran}} \quad \left(\frac{\text{dpm}}{\text{dpm}} \right)$$

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Gesunden und 4 Homozygoten. (n) drückt die Zahl der untersuchten Zelllinien aus.

<u>Lipoprotein</u>	<u>Zellen</u>	<u>Verhältnis $\pm$ SD</u>
LDL von Gesunden	Zellen von Gesunden (n = 5)	1,04 $\pm$ 0,03
	Zellen von Homozygoten (n = 4)	1,17 $\pm$ 0,05
LDL von Homozygoten	Zellen von Gesunden (n = 5)	1,79 $\pm$ 0,09
	Zellen von Homozygoten (n = 4)	2,68 $\pm$ 0,23

IV. DISKUSSION

Es wurden vergleichend Aufnahme, Internalisation und Abbau von ^{125}J -LDL durch Hautfibroblasten von Gesunden, sowie von heterozygoten und homozygoten Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie gemessen. Homozygote Zellen zeigen im Vergleich zu gesunden Zellen eine deutlich reduzierte Aufnahme, sowie einen verlangsamten Abbau von ^{125}J -LDL. Die Werte der Heterozygoten liegen zwischen den Werten der Gesunden und der Homozygoten.

Diese Unterschiede finden sich bei Zugabe von LDL von Gesunden wie auch von LDL von homozygoten Hypercholesterinämikern. Im letzten Falle sind die Unterschiede etwas größer. Damit wurde gezeigt, daß sich die bekannten Unterschiede in der Struktur der LDL in einer veränderten Aufnahme und einem veränderten Abbau widerspiegeln.

Die schlechteste Aufnahme fand statt, wenn LDL von Homozygoten zu Zellen von Homozygoten zugegeben wurde. Dies entspricht der Situation beim homozygoten Patienten. Andererseits kann die Aufnahme von LDL von Homozygoten, durch die Zellen von Homozygoten, im Vergleich zu anderen Kombinationen, durch Zugabe von 1% Dextran, im Inkubationsmedium gesteigert werden.

Die ausgeprägte Wirkung von Dextran auf eine Aufnahme der LDL von Homozygoten beruht möglicherweise auf

deren stärkerer Hydratation (3). Aufgrund seiner zahlreichen Polyolgruppen bindet Dextran Wasser. Nach den Untersuchungen von Grant (3) haben LDL ebenfalls eine Hydrationshülle. Blohme et al konnten zeigen, daß isolierte LDL in Dextranlösung konzentrationsabhängig ausfallen. Dieses Präzipitationsphänomen liegt möglicherweise der vermehrten Aufnahme von ^{125}J -LDL durch Zellen zugrunde, wenn Dextran zum Medium zugegeben wird.

Eine Beeinflussung der LDL-Aufnahme, bei der keine Unterschiede für die verschiedenen LDL beobachtet wurden, war durch Vorinkubation der Zellen mit Glucosaminidase oder Vorinkubation der LDL mit Neuraminidase festzustellen.

Vorinkubation der Zellen mit Glucosaminidase führt zu einer reduzierten Aufnahme. Daraus kann man schließen, daß an der Zelloberfläche gebundenes N-Acetylglucosamin die Aufnahme der LDL begünstigt. Das gebundene N-Acetylglucosamin kann Bestandteil von Glycoproteinen oder von Glycosaminoglycanen sein. Insbesondere Glycosaminoglycane haben eine hohe Affinität für LDL und sind an der Zelloberfläche zu finden.

Nach Vorinkubation der LDL mit Neuraminidase wird die LDL-Aufnahme höher. Das bedeutet, daß auf der LDL-Oberfläche gebundene Neuraminidase die Aufnahme verzögert.

Es ist von anderen Serumglycoproteinen bekannt, daß ihre Elimination aus dem Blut durch Behandlung mit Neuraminidase gesteigert wird, so daß die LDL hier einem allgemeinen Prinzip des Katabolismus folgen (25).

Zur Steigerung der LDL-Aufnahme durch Dextran ist anzumerken, daß klinische Untersuchungen eine Reduktion des Serumcholesterins durch Dextraninfusionen zeigten (6, 7).

Der Effekt war umso stärker, je höher der Ausgangsspiegel war (6). Die berichteten Cholesterinspiegel werden nur bei den familiären Hypercholesterinämikern gefunden, so daß die Steigerung der Elimination auf der Basis unserer Zelluntersuchungen verständlich wird.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

Low Density Lipoproteine (LDL d = 1,019 - 1,063 g/ml) wurden mit ^{125}J -Monochlorid markiert und zu konfluenten Kulturen von normalen, heterozygoten und homozygoten familiär hypercholesterinämischen Hautfibroblasten zugegeben.

LDL von Gesunden und von Hypercholesterinämikern wurden in getrennten Experimenten untersucht. Gesamtaufnahme, Internalisation und Abbauprodukte im Medium wurden gemessen. Signifikante Unterschiede in allen drei Parametern zwischen Gesunden, Heterozygoten und Homozygoten wurden festgestellt, wenn LDL von Gesunden zugegeben wurde. Die Unterschiede waren sogar größer, wenn LDL von Patienten zugegeben wurden. Es wurde versucht, Aufnahme und Abbau von LDL durch die Zellen zu modifizieren.

Aufnahme, Abbau und Internalisation wurden durch Zugabe von Dextran zum Inkubationsmedium erhöht. Der Abbau war ebenfalls höher, wenn die LDL mit Neuraminidase vorbehandelt wurde. Alle Parameter waren aber erniedrigt, wenn die Zellen mit N-Acetylglucominidase vorbehandelt wurden.

R E F E R E N C E S

- 1) J.L. Goldstein and M.S. Brown
J. Biol. Chem. 249, 5153-5162 (1974)
- 2) Y.K. Ho, M.S. Brown, H.J. Kayden and J.L. Goldstein
J. Exo. Med. 144, 444-455 (1976)
- 3) E.H. Grant, R.J. Sheppard, G.L. Mills and Joan Slack
Lancet 72, 1, 1159-1161 (1972)
- 4) T.F. Bagnall
Clin. Chim. Acta 42, 229-233 (1972)
- 5) S. Chatterjee and P.O. Kwiterovich
Lipids, 11, 462-466 (1976)
- 6) C.Th. Flotte and R.W. Buxton
Circulation, Supp. II, II-85 Vol. 32 (1965)
- 7) G. Blohme, J. Kerstell and A. Svanbord
Acta Med. Scand. 183, 481-481 (1968)
- 8) R.J. Havel H.S. Eder and J.H. Bragdon
I. Clin. Invest. 34, 1345-1353 (1955)
- 9) C.M. Radding and D. Steinberg
J. Clin. Invest. 39, 1560-1569 (1960)
- 10) T.G. Redgrave, D.C.K. Roberts and C.E. West
Anal. Biochem. 65, 42-49 (1975)
- 11) R.I. Levy, R.S. Lees and D.S. Frederickson
J. Clin. Invest. 45, 63-77 (1966)

- 12) L.L. Rudel, J.A. Lee, M.D. Morris and J.M. Felts
Biochem. J. 139, 89-95 (1974)
- 13) O. Ouchterlony (1968)
Handbook of Immunodiffusion and Immuno-electrophoretic
Techniques, Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor,
Michigan 21
- 14) P. Van der Bijl and C.M. Van Gent
Clin. Chim. Acta 63, 407-409 (1975)
- 15) A. Zlatkis, B. Zak and A.J. Boyle
J. Lab. Clin. Med. 41, 486-492 (1957)
- 16) O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and L.J.
Randall
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
- 17) J.B. Stanbury, J.B. Wyngarden and D.S. Frederickson
The Metabolic Basis of Inherited Disease, McGraw
Hill Book Company, New York, p. 569 (1974)
- 18) H. Dörfler, A. Wieczorek, G. Wolfram and N. Zöllner
Res. Exp. Med. 170, 161-168 (1977)
- 19) A.S. McFarlane
Nature, 182, 53 (1958)
- 20) J. Shepherd, D.K. Bedford and H.G. Morgan
Clin. Chim. Acta 66, 79-109 (1976)
- 21) O. Stein, D.B. Weinstein, Y. Stein and D. Steinberg
Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 14-18 (1976)
- 22) R.G.W. Anderson, M.S. Brown and J.L. Goldstein
Cell, 10, 351-364 (1977)

- 23) D.V. Zilversmit, C. Entenman and M.C. Fishler
J. Gen. Physiol. 26, 325-331 (1943)
- 24) S. Chatterjee and P.O. Kwiterovich
Fed. Proc. 35, Abstr. 1459 (1976)
- 25) G. Gregoriadis, D. Putman, L. Louis and D. Neerunjun
Biochem. J 140, 323-330 (1974)

Lebenslauf

Ich bin am 14.11.1946 in Sofia, Bulgarien geboren.
Am 4.7.1965 habe ich mein Abitur gemacht. Ich bin
am 1.2.1967 nach München gekommen, wo ich anfangen
habe zu studieren.

1967 - 1968 Studienkolleg

1968 - 1971 Biologie Vordiplom

1973 - 1978 Zahnmedizin

Am 16.11.1978 habe ich die zahnärztliche Prüfung
bestanden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden in der Zeit
von 1976 bis Mitte 1977 in der Forschergruppe Ernährung
an der Mediz. Poliklinik der Universität München unter
Anleitung von Dr. A. Wieczorek durchgeführt.

Herrn Dr. A. Wieczorek, Prof. Dr. Ch. Barth
und Prof. Dr. N. Zöllner möchte ich für
die Überlassung des Themas und die uner-
müdliche Unterstützung bei der Durchführung
der Arbeit herzlich danken.

